

First, to 300 ml of a JIS K3363 medium (NH_4Cl 0.3%, K_2HPO_4 0.1%, KCl 0.025%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0002%, yeast extract 0.03%, and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%) containing 10 ppm of polyethylene glycol dodecyl ether (EOp=7, hereinafter, abbreviated as EO-7) which is one kind of polyoxyethylene-based nonionic surfactants as a carbon source, 20 ml of activated sludge were added and the whole was cultivated at 25°C while shaking. The concentration of EO-7 was increased in series of 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800, and 1,000 ppm, and an enrichment culture was attempted. As a result, after 25 days, the concentration reached to 1,000 ppm. The decomposition degree of EO-7 was measured by disappearance of bubbles, a cobalt isothiocyanate method (JIS K3364), and a gas chromatography analysis.

To a JIS agar medium containing 500 ppm of EO-7, a culture solution in which the decomposition was completed at 1,000 ppm of EO-7 was added and the whole was cultivated at 32°C for 24 hours, followed by collection of a single colony. After that, a plating method was repeated three times and a microorganism having an excellent decomposing ability was isolated. The microbe was acclimated to a concentration of 1,000 ppm of EO-7 again. The decomposition degree of EO-7 of the acclimated microbe was examined, and as a result, about 80% of EO-7 were decomposed through cultivation for 13 hours. The microbiological properties of the acclimated microbe (hereinafter, tentatively referred to as EO microbe) were

examined and the microbe was confirmed to belong to a novel microbial species.

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 52-057389

(43)Date of publication of application : 11.05.1977

(51)Int.Cl.

C12K 1/00
// C12K 3/00
C12D 13/10

(21)Application number : 50-132423

(71)Applicant : LION CORP

(22)Date of filing : 06.11.1975

(72)Inventor : NEGI TAHE
SUGIYAMA KEIKICHI

(54) METHOD OF DECOMPOSING NONIONIC SURFACTANTS

(57)Abstract:

PURPOSE: To convert waste water containing polyoxyethylene type nonionic surfactants into harmless form by using a specific species of Pseudomonas genus.



① 日本国特許庁

公開特許公報

①特開昭 52-57389

④公開日 昭52.(1977) 5.11

②特願昭 50-132423

②出願日 昭50.(1975) 11.6

審査請求 未請求 (全5頁)

庁内整理番号

7235 49
7235 49
7048 49

⑤日本分類

362A53
362B3
362C0

⑤ Int.Cl?

C12K 1/00H
C12K 3/00
C12D 13/10

識別
記号

特許庁長官 斎藤 英雄 殿

1 発明の名称 非イオン界面活性剤の分解方法

2 発明者

住 所 千葉県千葉市小仲台4の3の18の405
氏 名 杉 宜 太 兵 衛 (ほか1名)

3 特許出願人

住 所 東京都墨田区横網一丁目2番22号
名 称 ライオン油脂株式会社
代 表 者 小 林 宏

4 代 理 人 〒104

住 所 東京都中央区八重洲5丁目5番地
八重洲5の5ビル 電話東京(271)3828
氏 名 (7352) 井 理 士 後 藤 通 生

5 添付書類の目録

- (1) 明 細 書 1 通
- (2) 願 審 副 本 1 通
- (3) 委 任 状 1 通
- (4) 微生物培養委託申請書受理番号票 1 通

方 式

明 細 書

1 発明の名称 非イオン界面活性剤の分解方法

2 特許請求の範囲

シユードモナス属に属し非イオン界面活性剤分解能を有する微生物を培地に培養し、得られた菌体又は菌体の処理物をポリオキシエチレン系非イオン界面活性剤と接触させることを特徴とするポリオキシエチレン系非イオン界面活性剤を分解処理する方法。

3 発明の詳細な説明

本発明はポリオキシエチレン系非イオン界面活性剤分解能を有し、シユードモナス属に属する微生物を培地に培養し、生育した微生物の菌体又は菌体を常法により処理した処理物をポリオキシエチレン系非イオン界面活性剤に作用させ、これを分解処理する方法に関する。

従来より非イオン界面活性剤は陰イオン系界面活性剤とともに、家庭用洗剤として、また工業用洗剤として広く使用されている。特に

アルキルエーテル型、アルキルアリルエーテル型、アルキルエステル型、ソルビタンモノエステル型等のポリオキシエチレン系非イオン界面活性剤は、魚毒性、皮膚刺激性等の生物体に対する影響が小さく、使用後は水として最終的に下水処理場等における設備により分解処理される。該廃水の処理法としては活性汚泥法、生物安定池法、固定接触法等の生物処理法が広く採用されている。しかしながらこれら生物処理法は木々に処理効率が低いため、長い処理時間および設備規模の大型化を必要とされている。このことは、一般に知られた活性汚泥等の多様な微生物混合系が十分な処理能力を有しないことによる。本発明者らは廃水中のポリオキシエチレン系非イオン界面活性剤を高濃度においても効率よく短時間に分解し、ひいては処理設備を減少しうる方法について鋭意研究

を覆ねた。

その結果、本発明者等はシユードモナス属の新菌種に属する微生物の菌体内生産物が顕著に非イオン界面活性剤分解能を有することを発見し本発明を完成した。

先づポリオキシエチレン系非イオン界面活性剤の1種であるポリエチレングリコールデシルエーテル(B0P-7以下B0-7と略称する)を炭素源として10ppm含有するJIS K 5363培地(NH₄Cl 0.3%、K₂HPO₄ 0.1%、KCl 0.025%、FeSO₄·7H₂O 0.0002%、イーストエキストラクト 0.03%、MgSO₄·7H₂O 0.025%)300mlに、活性汚泥20mlを添加し25℃で振とう培養した。B0-7の濃度を10、50、100、200、400、600、800、1000ppmと順次上昇させ集積培養を試み、25日間で1000ppmにまで達した。B0-7の分解度の測定は泡沫の消失、コバルトテオシアネート法(JIS K 5364)、ガスクロマト分析によつて行なつた。

円形(0.4~0.5cm/3日)、均質、薄く中央凸、表面平滑、無色、光沢、中央少し赤、粘糊、辺縁平滑、不透明

斜面培地(肉汁寒大培地)

発育中、厚く、表面平滑、無色、形状一様、辺縁平滑、無臭

せんし培養

発育の程度有、表面の発育有、発育の狀態線状

液体培地(肉汁培地)

発育の程度微弱、沈殿無、ガス発生無、無臭、着色無、濁り一様、表面発育無、メチレンブルー色調変化無

酸素要求性 好気性

増殖温度 20~36℃ 最適36℃

増殖pH 5.0~9.0 最適7.3

色素産生 無

ゼラチン 液化せず

リトマス・ミルク培地 還元(アルカリ化、酸性化せず)
(ペプトン化、凝固せず)

特開 昭52- 57389(2)

B0-7 1000ppmで分解が完了した培養液をB0-7 500ppm含有JIS寒大培地に加へ32℃、24時間培養し、単一コロニーを収り出し平板分離を3回繰り返してB0-7分解力の勝れた微生物を単離した。この菌を再度B0-7 1000ppmの濃度まで馴化し、この馴化菌のB0-7の分解度を検したところ13時間の培養でB0-7の約80%を分解した。この馴化菌(以下B0菌と仮称する)の菌学的性質を検したところ新菌種に属することを確認した。

本B0菌をバージース マニュアル オブ デターミナティブ バクテリオロジイ 第8版の方法並びに其他の文献を参考にしてその形態学的及び生理学的性質を検した結果は下記の如くである。

形態学的性質

形態 桿菌、0.7~0.8×1.4~2.8μ

鞭毛 単毛、運動性有(弱)

グラム染色性 陰性

菌体の軸 直線

菌形培地表面集落(肉汁寒大培地)

生理学的性質

硝酸還元 + (N₂発生)

硝酸呼吸 + (N₂発生)

グルコースの酸化分解 + (酸酵せず)

オキシダーゼ +

カタラーゼ + (強)

アルギニンヒドロラーゼ +

インドール産生 -

硫化水素発生 -

尿素分解 -

カロチノイド産生 -

中性紅の還元 -

メチレンブルーの還元 -

デンプンの加水分解 -

V.P.反応メチルレッド試験 -

アンモニア生成 + (弱)

糖の分解(酸の生成)

グルコース +

キシロース -

ラクトース -

シユークロース -
デンプン -
グリセリン -

唯一の炭素源としての利用性

グルコース	+	コハク酸	+
キシロース	+	(弱) クエン酸	+
ラクトース	-	グルコン酸	+
シユークロース	+	プロトカテキニ酸	+
デンプン	-	安息香酸	+
グリセリン	+	サルチル酸	-
ブコース	-	PAB (P-ヒドロキシ安息香酸)	+
トレハロース	-	ベタイン	+
ノゾイノシトール	-	PAB (P-アミノ安息香酸)	-
β-アラニン	+	ゲンチジン酸	+
α-アルギニン	+	(弱)	
DL-アルギニン	+	アントラニル酸	-
α-バリン	+		
β-トレニン	+		

上記の如く本 E O 菌はグラム陰性の桿菌であり、単毛で運動し、好氣的にグルコースを分解し

酸を生成する。オキシダーゼ、カタラーゼ陽性などの点からシユードモナス属の一種に属すると同定した。更に種の検索を行い E O 菌の類縁菌種と見られるシユードモナス属に属する 8 種の菌種を選び種々の生理学的性質につき比較検討した。この比較結果を下記に表示する。

E O 菌とシユードモナス属の類縁菌との性状比較表

菌 種	性 質	蛍光 色素	ピオン アミン	41℃ での 生育	脱窒 作用	セラチン 液化	でんぷん 加水 分解	硫化 水素	カロチ ノイド 生成
E O 菌		-	-	- max 36℃	+	-	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i>		d	d	+	+	+	-	-	
<i>Ps. putida</i>		+	-	-	-	-	-	-	
<i>Ps. syringae</i>		+	-	-	-	d	-	-	
<i>Ps. cichorii</i>		+	-	-	-	-	-	-	
<i>Ps. stutzeri</i>		-	-	d	+	-	+	-	
<i>Ps. mendocina</i>		-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Ps. alcaligenes</i>		-	-	+	-	+	-	-	
<i>Ps. denitrificans</i>		-	-	-	+	-	-	+	

+ : 90%以上陽性

- : 90%以上陰性

d : 10%~90%の間で陽性

上記 E O 菌の菌学的性質並びに類縁菌との比較表の示す如く、E O 菌は硝酸呼吸能を有し脱窒作用を示すこと、色素を生成しないこと、生育温度の最高は 36℃であることに特徴を有し、これらの性質のうち蛍光色素を生成せず、脱窒作用を示す *Ps. stutzeri* は 41℃でかなり生育すること、でんぷんを加水分解すること、リトマスミルク培地でアルカリ化すること、グルコースを分解しないことなどの点で E O 菌と異なっている。又 *Ps. mendocina* は 41℃で生育すること、カロチノイドを生成する点で E O 菌と異なり、*Ps. denitrificans* は硫化水素を発生すること、グルコースを分解しない点で E O 菌と相違している。シユードモナス属の菌種において生育温度の差違は菌種を区別する重要な条件といえることができる。

以上の点で E O 菌は従来記載されている菌種の性状と一致しないので、E O 菌を新菌種に属する菌と同定し、シユードモナス nov. Sp. LF3101 (微上研菌寄受理第 3299) と仮称する。

本発明方法を実施するにあたっては、前記した通り JIS K 5363 培地で馴化したポリオキシエチレン系非イオン界面活性剤分解菌を培地に培養して、生育した菌体をポリオキシエチレン系界面活性剤を含有する溶液に懸濁して反応させるか又は菌体を常法により処理し、例へば洗浄、超音波処理、凍結融解処理或はホモジナイザー処理その他の破砕抽出処理等を施し、分離又は分離せずしてポリオキシエチレン系界面活性剤に接触せよ。界面活性剤の分解度はコバルトチオシアネート活性の低下率をもつて示した。

尚上記処理物を常法により精製して活性を高めた活性物質を取得し、各種酵素的特性も調べた。これら活性物質も本発明の分解処理方法に使用できることは勿論である。かくして本発明方法により効率よく非イオン界面活性剤を分解処理することができた。

以下実施例を示す。

実施例 1

β₀ 菌を斜面培地から10 mlトリプトソイブ
ロス中に移植し、18時間30℃で前培養した。
これを種培養としてポリエチレングリコール
デシルエーテル(β₀P-8)を炭素源として
各50、100、200、400、600 ppm含有JIS
培地200 ml中に移植して馴化を行つた。600
ppm培地でのβ₀ 菌によるこれら界面活性剤の
分解度については、最初コバルトチオシアネー
ト活性100%のものがポリエチレングリコー
ルドデシルエーテル(β₀P-8)の場合12時
間で2.5%、24時間で20%、1週間で20
%に低下した。

実施例 2

ポリエチレングリコールデシルエーテル
(β₀P-8)を含有するJIS K 3363 培地で
馴化したβ₀ 菌の生分解終了培地より得た洗浄
菌体を用いて、種々の非イオン界面活性剤の分
解試験を行つた。

先づ500 ppmの上記生分解終了培地900

mlを遠心分離して菌体を集め、生理的食塩水で
1回洗浄したものを洗浄菌体とした。培地900
mlあたり菌体湿重量は約1.6gであつた。

供試非イオン界面活性剤は下記の通りである。

ポリオキシエチレングリコールノニルフエニ
ルエーテル(β₀P-9)

甘酸アルコール(C₁₂~C₁₈) エトキシレート
(β₀P-8) (商品名リボノックス IOHライ
オン油脂 K.K. 製)

ポリエチレングリコールデシルエーテル
(β₀P-8)

ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエー
ト (商品名 Tween 80、東京化成 K.K. 製)

ポリエチレングリコール (mw=400, PBQ400)

約1.6gの菌体を20 mlのトリス塩酸液(pH7.5
5.0×10⁻²M)に懸濁させ、これに20 mlの各
種非イオン界面活性剤(1000 ppm水溶液)
20 mlを加へた。30℃で振とう(60回、1分)
し、随時的に反応液を4 ml採取し遠心した上清
のコバルトチオシアネート活性を測定して分解

度をしらべた。分解度は下表の通りである。

基 質	コバルトチオシアネート活性		
	0 hr	1 hr	4 hr
ポリオキシエチレングリコール ノニルフエニルエーテル	100	66	53
I O H	100	80	70
ポリオキシエチレングリコール ドデシルエーテル	100	80	70
ポリオキシエチレンソルビタンモノ オレート Tween 80	100	97	94
P B Q 4 0 0	100	97	94

実施例 3

ポリエチレングリコールデシルエーテル
(β₀P-7) 600 ppm含有JIS 培地で30℃、
24時間培養した培養液15 mlを8000rpm
(10000G) 10分間遠心分離し上清と菌体
とに分けた。上清を脱塩後、凍結乾燥により
50 mlまで濃縮した。一万菌体は0.85%生理
的食塩水で2回洗浄した後、5 mMトリス塩酸液
に懸濁させ、超音波細胞破砕機(大岳製作所製

150W 20KC)を用いて超音波処理を行つた。

超音波処理液は18000 rpm (3.9力G) 30分
遠心分離し上清の酵素活性を調べた。結果は下
表の通りである。

試 料	蛋白 (g/ml)	比活性 (u/mg蛋白)
培養液上清	2.7	0.00
音波処理上清	3.64	0.62

反応系：基質 ポリエチレングリコールデシルエー
テル(β₀P-7) 2 mM、トリス塩酸溶液
(pH7.5) 50 mM 中35℃振とう条件下で
反応を行つた。

活 性：ガスクロマトグラフ(GLC)を用い出発物
質の減少度から表示し、1 mlの酵素液が
35℃、60分で1 μmolの基質分解能を持
つとき1単位とした。

上記の通り酵素は菌体に存在し、音波処理で
可溶化されることがわかつた。

特許出願人 ライオン油脂株式会社

代 理 人 後 藤 道 生

6. 明記以外の発明者

任 所 ^{イタリヤ} 千葉県市川市新出 1-9-3
氏 名 ^{スギヤマ} 杉山 圭 吉